



Kongeriget Danmark

Patent nr. DK/EP 1042458

Det europæiske patent på den opfindelse, som er angivet i vedlagte oversættelse af europæisk patentskrift, har fået virkning for Danmark. På patentskriftets forside findes oplysning om patenthaver, om dagen for Den Europæiske Patentmyndigheds bekendtgørelse af patentets meddelelse, om dagen for bekendtgørelse af dansk oversættelse af patentskriftet og om den europæiske indleveringsdag, som er dagen, fra hvilken patenttiden løber.

Patentets virkning for Danmark er meddelt i medfør af patentloven, jf. lovbekendtgørelse nr. 587 af 2. juli 1993.

22. marts 2004

Patent- og Varemærkestyrelsen
Økonomi- og Erhvervsministeriet

Jesper Kongstad
Direktør



PATENT- OG VAREMÆRKESTYRELSEN

NZAS-0012471

(19) **DANMARK**

(10) **DK/EP 1042458 T3**



Patent- og
Varemærkestyrelsen

(12) **Oversættelse af
europæisk patentskrift**

-
- (51) Int.Cl⁶: C 12 N 11/02 C 12 N 11/14
- (45) Oversættelsen bekendtgjort den: 2004-03-22
- (80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds
bekendtgørelse om meddelelse af patentet: 2003-11-12
- (86) Europæisk ansøgning nr.: 98959787.7
- (86) Europæisk indleveringsdag: 1998-12-16
- (87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: 2000-10-11
- (86) International ansøgning nr.: PCT/DK98/00554
- (87) Internationalt publikationsnr.: WO99033964
- (30) Prioritet: 1997-12-23 DK 152797
- (84) Designerede stater: AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI NL PT SE
- (73) Patenthaver: Novozymes A/S, Krogshøjvej 36, 2880 Bagsværd, Danmark
- (72) Opfinder: CHRISTENSEN, Morten, Würtz, Lyngparken 52, 2800 Kongens Lyngby, Danmark
KIRK, Ole, Bisp Pedersvej 4, 2830 Virum, Danmark
PEDERSEN, Christian, Valhøjvej 89, 3.th, 2610 Rødovre, Danmark
-
- (54) Benævnelse: Fremgangsmåde til immobilisering af enzymer
- (56) Fremdragne publikationer:
EP-A1- 0 140 542
WO-A1-95/22606
WO-A2-94/26883

OPFINDELSENS OMRÅDE

5 Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat til anvendelse i et overvejende organisk medie, der er i alt væsentligt frit for ubundet vand, og anvendelse af det immobiliserede enzympræparat til organisk syntese.

OPFINDELSENS BAGGRUND

10 Det er kendt, at immobiliserede enzymer anvendes til organisk syntese.

De mest almindeligt immobiliserede enzymer er lipaser, der anvendes til esterificeringsreaktioner i overvejende organiske medier, der er i alt væsentligt frit for ubundet vand.

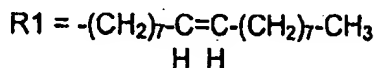
15 I EP 140 542 B2 beskrives en proces, hvor et enzymholdigt væskeformigt stof bringes i kontakt med et bærestof af svag anionbytterharpiks ved at dispergere bærestoffet i det væskeformige stof og opblande ved omrøring med en magnetomrører, hvorved enzymet immobiliseres på bærestoffet. Immobiliseringen efterfølges derefter af vakuumtørring af enzym-bærestoffet.

20 I WO 95/22606 beskrives en proces, hvor et enzymholdigt væskeformigt stof bringes i kontakt med bærestof af porøs silica ved at sprøjteforstøve det væskeformige stof ud på bærestoffet i et blandeapparat efterfulgt af tørring natten over ved omgivelsestemperatur.

25 I industrielle immobiliseringsprocesser, der er beskrevet i faglitteraturen, anbringes bærestoffet eller støttematerialet i en kolonneformet adsorptionsbeholder, og en enzymholdig væske recirkuleres, indtil der er opnået tilstrækkelig adsorption af enzymet på bærestoffet. Efter adsorptionstrinet tømmes kolonnen ved manuelt at skovle enzym-bærestofproduktet over i bakker. Produktet tørres derpå ved at anbringe bakkene under vakuum ved stuetemperatur i et tidsrum på 14-16 timer.

30 I WO 94/26883 beskrives en proces til fremstilling af støvfrie enzymgranuler ved at absorbere enzymet på et porøst materiale, hvilket materiale indeholder NaCl, natron og silica, og eventuelt coate produktet med et beskyttende ydre

reaktant (reaktant 2), f.eks. en alkohol, idet substituenterne R1 og R2 ombyttes i den nævnte reaktion. R1 og R2 kan for eksempel være:



SAMMENDRAG AF OPFINDELSEN

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer alternative processer til industriel immobilisering af enzymer, der i signifikant grad forøger kapaciteten og reducerer arbejdsmkostningerne, ved hjælp af standard procesudstyr med flere anvendelsesmuligheder.

Således tilvejebringer opfindelsen processer til fremstilling af et immobiliseret enzympræparat til anvendelse i et overvejende organisk medie, der er i alt væsentligt frit for ubundet vand, som i et første aspekt omfatter:

- a) fluidisering af et partikelformigt, porøst bærestof i en fluid bed,
- b) tilføring af et enzymholdigt væskeformigt medie ved sprøjteforstøvning ind i fluid bed'en for således at adsorbere enzymet på bærestoffet, og
- c) fjernelse af flygtige komponenter af det væskeformige medie fra bærestoffet i fluid bed'en.

I et andet aspekt omfatter processerne:

- a) at bringe et enzymholdigt væskeformigt medie i kontakt med et partikelformigt, porøst bærestof med en i alt væsentligt hydrofob overflade for således at adsorbere enzymet på bærestoffet, og
- b) tilføring af et partikelformigt, hygroskopisk stof, for således at undertrykke agglomering af bærestoffet,
- c) fjernelse af flygtige komponenter af det væskeformige medie og det hygroskopiske stof fra det nævnte produkt i en fluid bed.

I en anden udførelsesform for opfindelsen omfatter bærestofpartiklerne et hydrofilt uorganisk materiale som beskrevet i den første udførelsesform, der er coatet med organiske grupper og således har en overvejende hydrofob overflade, f.eks. som beskrevet i JP 09 000 257-A, hvori et syrebehandlet kaolimbærestof er coatet med N-phenyl-gamma-aminopropyltrimethoxysilan. Yderligere bærestoffer er beskrevet i JP 08 126 489-A, hvori et vand-uopløseligt bærestof er coatet med en polymer, der danner en disulphid-binding med enzymer. En tredje type bærestoffer er beskrevet i *Biotechnology Techniques* vol. 3 No. 5 345-348, hvori et keramisk bærestof er coatet med polyethylenamin, polyethylenimin eller 3-aminopropyltriethoxysilan, idet alle tre overfladetyper gør det muligt for et enzym at blive kovalent bundet gennem glutaraldehydkobling.

I en tredje udførelsesform for opfindelsen omfatter bærestofpartiklerne en organisk polymerharpiks med en overvejende hydrofob overflade. Harpiksen kan være en adsorberende harpiks, fortrinsvis et polyacrylat, et polymethacrylat (f.eks. polymethylmethacrylat), polystyren tværbundet med divinylbenzen, polyurethan eller polypropylen, eller harpiksen kan være en ionbytterharpiks, fortrinsvis en anionbytterharpiks, f.eks. en svagt basisk anionbytterharpiks. En foretrukket anionbytterharpiks er en Duolitharpiks af phenoltype fra Rohm og Haas.

Endvidere kan bærestoffet være fremstillet ud fra regenereret chitosan som beskrevet i DE 4 429 018-A.

ENZYMET

Det enzym, der ifølge opfindelsen skal immobiliseres, kan være et hvilket som helst enzym, der er egnet til anvendelse i medier, der er i alt væsentligt frie for ubundet vand. De mest almindeligt anvendte enzymer er lipaser, og i en specifik udførelsesform for opfindelsen kan lipasen være afledt fra en stamme af slægten *Humicola* (også kendt som *Thermomyces*), *Pseudomonas*, *Candida* eller *Rhizomucor*, fortrinsvis arterne *H. lanuginosa* (også kendt som *Thermomyces lanuginosa* som beskrevet i US 4 810 414 og EP 305 216, som medtages heri ved henvisning), *C. antarctica* eller *R. miehei*.

5 i. I én udførelsesform for opfindelsen kan immobiliseringen af enzym på et bærestof, der har en i alt væsentligt hydrofil overflade, således udføres i et standard blandeudstyr (f.eks. Lödiger, Tyskland), hvor et enzymholdigt væskeformigt stof ved sprøjteforstøvning tilføres til det tørre porøse og partikelformige bærestof under blanding, f.eks. ved anvendelse af en forstøver, der er forbundet med en pumpe (f.eks. en standard peristaltisk Watson-Marlow pumpe).

10 Det væskeformige stof bør tilsættes i sådanne mængder, at der i alt væsentligt ikke sker nogen agglomerering af bærestoffet, og således muliggøre den efterfølgende tørring af enzym-bærestofproduktet ved at fluidisere produktet i et standard fluid bed-udstyr, f.eks. et Uni-Glatt fluid bed-apparat (Glatt, Tyskland), og derved fjerne flygtige komponenter.

15 ii. I en anden udførelsesform for opfindelsen kan immobiliseringen af enzym på et bærestof, der har en i alt væsentligt hydrofil overflade, alternativt udføres i et standard fluid bed-udstyr, f.eks. et Uni-Glatt fluid bed-apparat (Glatt, Tyskland), hvor det tørre, porøse og partikelformige bærestof fluidiseres og et enzymholdigt væskeformigt stof ved omgivelsestempertur ved
20 sprøjteforstøvning tilføres til det fluidiserede bærestof, f.eks. ved anvendelse af en forstøver, der er forbundet med en pumpe (f.eks. en standard peristaltisk Watson-Marlow pumpe). I denne udførelsesform foretages immobilisering og tørring samtidigt.

25 IMMOBILISERING PÅ BÆRESTOFFER MED EN HYDROFOB OVERFLADE

Uden at være bundet af teorien kan man forestille sig, at immobilisering af enzym på bærestoffer, der har en i alt væsentligt hydrofob overflade, indebærer adsorption af enzymet på overfladen. Immobiliseringen kan
30 muliggøres ved, at enzymet danner hydrogenbindinger, ionbindinger eller kovalente bindinger med grupper i overfladen.

iii. I en tredje udførelsesform for opfindelsen kan immobiliseringen af enzym på et bærestof, der har en i alt væsentligt hydrofob overflade, således udføres i et standard blandeudstyr, hvori et enzymholdigt væskeformigt stof tilføres til det tørre, porøse og partikelformige bærestof i en mængde således, at der dannes
35 en pasta eller en opslæmning. Pastaen eller opslæmningen blandes i et

Endvidere har lufttilførslen en øvre grænse, da tilførslen skal være tilstrækkelig til at holde enzym-bærestoffet fluidiseret, men ikke så kraftig, at den forårsager "blow-off" af enzym-bærestoffet.

5. Passende temperaturer af den tilførte luft til fjernelse af flygtige komponenter vil primært afhænge af enzymets termiske stabilitet (inaktiveringstemperaturen). Temperaturen kan være 40-90 °C, fortrinsvis 50-70 °C, f.eks. 60 °C. En højere temperatur tilvejebringer kortere immobiliserings- og tørringstider.

10

- Endvidere vil tidsforbruget til immobilisering og/eller tørring af enzym-bærestoffet, når udstyr, lufttilførsel og lufttemperatur er fastsat, være afhængig af mængden af enzym-bærestof. Processen til immobilisering/tørring kan overvåges ved at måle temperaturen af tilført og fraført luft. Mens enzym-bærestoffet er fugtigt, er fraførselstemperaturen lavere end tilførselstemperaturen på grund af varmeabsorbering og fordampning af flygtige komponenter. Typisk indtræder en steady-state fordampning under processen til immobilisering/tørring, hvor fraførselstemperaturen stabiliseres på en temperatur, der er lavere end tilførselstemperaturen, hvilket indikerer, at fordampning af flygtige komponenter (dvs. varmeabsorbering) sker med en konstant hastighed. Ved slutningen af processen til immobilisering/tørring begynder fraførselstemperaturen at stige og nærme sig tilførselstemperaturen, hvilket indikerer, at varmeabsorberingen er formindsket, og at fugten fra enzym-bærestoffet således er blevet fjernet. Ved anvendelse af en fluid bed til samtidig immobilisering og tørring vil tørringsprocessen foregå, så længe det enzymholdige væskeformige stof bliver sprøjteforstøvet ind i fluid bed'en, og kan passende forlænges i 5-30 min efter afslutning af tilførslen af det enzymholdige væskeformige stof.

25
30

- Et vigtigt aspekt ifølge opfindelsen er, at immobiliseringsprocesserne nemt kan opskaleres ved at anvende andet, større standardudstyr. Således kan områderne for indstilling af udstyret, der er angivet ovenfor, justeres til at optimere til storproduktion

EKSEMPLERLIPASE-ASSAY

5 Den lipolytiske aktivitet kan bestemmes ved anvendelse af tributyrin som substrat. Denne fremgangsmåde er baseret på hydrolyse af tributyrin af enzymet, og forbrugt alkali registreres som en funktion af tiden.

10 En lipaseenhed (LU) defineres som den enzymmængde, der ved standardbetingelser (dvs. ved 30,0 °C; pH 7,0; med gummi arabicum som emulgeringsmiddel og tributyrin som substrat) frigiver 1 mmol titrerbar smørsyre pr. minut.

15 En folder AF 95/5, der beskriver denne analysemetode mere detaljeret, er tilgængelig efter anmodning til Novo Nordisk A/S, Danmark, hvilken folder medtages heri ved henvisning.

TRANS-ESTERIFICERINGSASSAY

20 a) 200 mg Trilaurin (Fluka) og 571 mg myristinsyre (8 molækvivalenter) myristinsyre (Merck) blev opløst i 20 ml heptan. 3 ml mættet NaCl-opløsning blev tilsat, og blandingen blev omrørt i en lukket kolbe i 24 timer ved omgivelsesens temperatur.

25 b) Det immobiliserede enzym (50 mg) blev vandækvilibreret i en dissikator (hermetisk lukket beholder) i 24 h, under anvendelse af gasfaseligevægt med en mættet NaCl-opløsning (vandaktivitet = 0,75).

30 c) Til T = 0 min blev det vandækvilibrerede, immobiliserede enzym og substrat blandet i en lukket kolbe, der blev anbragt i et rystebad ved 40 °C. Ved anvendelse af en sprøjte blev der udtaget 100 µl prøver fra den lukkede kolbe til T = 0, 10, 20, 30, 40, 50 og 60 min. Prøverne blev fortyndet (1:5 vol:vol) med en 50/50 (% v/v) blanding af acetone/acetonitril og analyseret på et HPLC-system.

35

5 Tyskland) ved anvendelse af en to-vejs forstøver i et Uni-Glatt (Glatt, Tyskland) fluid bed-apparat. Lipaseopløsningen blev påført gennem en peristaltisk pumpe (Watson-Marlow). Tilførselsluftens temperatur var 60 °C, og produkttemperaturen var 40 °C med en luftstrøm på 100 m³/h. Efter immobiliseringen var afsluttet, blev produktet tørret i yderligere 5 min i fluid bed'en.

Immobiliseringsprocessen blev testet på interesterificeringsassay'et, der målte 53 % omdannelse efter T = 24 h

10 EKSEMPEL 2

Adsorption af lipase på silicabaseret bærestof i fluid bed med samtidig fjernelse/fordampning af flygtige væskeformige stoffer.

15 94 g af en opløsning af *Humicola lanuginosa*-lipase (693 kLU/ml) fermenteringsopløsning blev fortyndet med 100 g demineraliseret vand og sprøjteforstøvet på 200 g Celite R648 (Manville, USA) i et Uni-Glatt (Glatt, Tyskland) fluid bed-apparat ved anvendelse af en to-vejs forstøver (lokalt fremstillet). Lipaseopløsningen blev påført gennem en peristaltisk pumpe
20 (Watson-Marlow) (strømningshastighed 238 g/h). Tilførselsluftens temperatur og produkttemperaturen var identiske med de i eksempel 1 angivne. Efter immobiliseringen var afsluttet, blev produktet tørret i yderligere 5 min i fluid bed'en.

25 Immobiliseringsprocessen blev testet på interesterificeringsassay'et, der målte 12 % omdannelse af trilaurin efter T = 24 h

EKSEMPEL 3

30 Adsorption af lipase på adsorberende harpiks i et blandeapparat og efterfølgende tørring i fluid bed under anvendelse af Hyper Flow Celite (HFC) til at lette tørringen.

35 94 g af en opløsning af *Humicola lanuginosa*-lipase (693 kLU/ml) blev fortyndet med 260 g demineraliseret vand. Opløsningen blev tilsat til 250 g adsorberende harpiks (en makroporøs med divinylbenzen tværbundet polystyren, Purolite AP 1090; fra Purolite, UK) i et 5 l blandeapparat (Lödiger,

5 kaolinbærestof (BIOFIX SC (500-250); fra ECC, UK) i et Uni-Glatt (Glatt, Tyskland) fluid bed-apparat under anvendelse af en tovejs-sprøjteforstøver (lokalt fremstillet). Lipaseopløsningen blev påført gennem en peristaltisk pumpe (Watson-Marlow)(strømningshastighed 238 g/h). Tilførselsluftens og produktets temperatur var henholdsvis 50 °C og 30 °C. Efter immobiliseringen var afsluttet, blev produktet tørret i yderligere 5 min i fluid bed'en (strømningshastighed 100 m³/h).

10 Immobiliseringsprocessen blev testet på interesterificeringsassay'et, der målte 34 % omdannelse af trilaurin efter T = 24 h

1000 m²/g, en partikelstørrelse på 200-1000 µm, og en hydrofob overflade, for således at adsorbere enzymet på bærestoffet, og

5 b) tilføring af et hygroskopisk stof for således at undertrykke agglomerering af bærestoffet ved absorbering af overskydende væskeformigt stof, og

c) fjernelse af flygtige komponenter af det væskeformige medie og det hygroskopiske stof fra produktet i en fluid bed.

10 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved det væskeformige stof tilføres i en sådan mængde, at der i alt væsentligt ikke sker nogen agglomerering af bærestoffet.

15 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved det uorganiske materiale fra trin (1) er valgt fra gruppen bestående af silicaer, zeolitter, aluminiumoxider og kaoliner.

20 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved det uorganiske materiale fra trin (2) er valgt fra gruppen bestående af silicaer, zeolitter, aluminiumoxider og kaoliner, der er coatet med organiske grupper for således at tilvejebringe en hydrofob overflade.

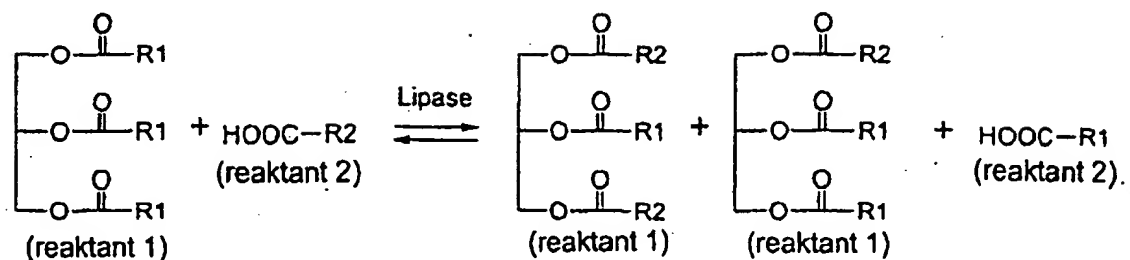
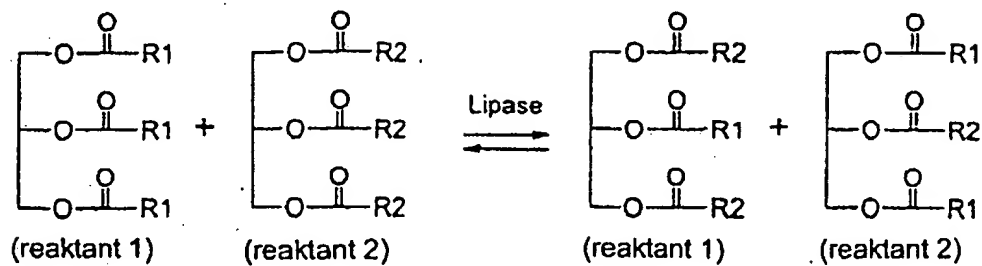
25 6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved den organiske polymerharpiks fra trin (3) er en adsorberende harpiks.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, hvorved den adsorberende harpiks er et polyacrylat, et polymethacrylat, en med divinylbenzen tværbundet polystyren, en polyurethan eller en polypropylen.

30 8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved den organiske polymerharpiks fra trin (3) er en ionbytterharpiks, fortrinsvis en anionbytterharpiks, mest fortrinsvis en svagt basisk anionbytterharpiks.

35 9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved det væskeformige medie er et vandigt medie.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved enzymet er en lipase.

Fig. 1: AcidolyseFig. 2: InteresterificeringFig. 3: Alkoholyse